NUOVI STUDI
DELLA
STAZIONE CHIMICO - AGRARIA SPERIMENTALE DI UDINE

PUBBLICAZIONE N. 70

MARIA VISINTINI - ROMANIN

RICERCHE SUI PIGMENTI ANTOCIANICI NELLA VITE E NEI VINI

NOTA I

NUOVI STUDI
DELLA
STAZIONE CHIMICO - AGRARIA SPERIMENTALE DI UDINE

PUBBLICAZIONE N. 70

MARIA VISINTINI - ROMANIN

RICERCHE SUI PIGMENTI ANTOCIANICI NELLA VITE E NEI VINI

NOTA I

ARTI GRAFICHE FRIULANE - UDINE - 1964

RICERCHE SUI PIMENTI ANTOCIANICI NELLA VITE E NEI VINI

NOTA I

Le conoscenze sui pigmenti antocianici della vite si sono allargate e approfondite in questi ultimi anni, con l'impiego delle moderne tecniche cromatografiche, in relazione a uno scopo eminentemente tecnologico. Gli studi sono stati infatti condotti più che altro sugli antociani dei vini rossi con il preciso fine di poter accertare, attraverso la presenza o meno di determinati pigmenti antocianici, l'eventuale aggiunta di vino proveniente da uve di vitigni ibridi euro-americani.

La separazione e identificazione cromatografica di antociani, dopo gli ampi studi di Ribéreau-Gayon, viene ormai impiegata comunemente nei laboratori enologici di controllo però secondo tecniche diverse. I metodi ormai numerosi sono stati criticamente revisionati recentemente da Garoglio (20) e da Biol e Michel (6).

Anche nel campo specifico dei pigmenti del vino, come normalmente avviene nel campo della ricerca in generale, l'affinamento delle tecniche analitiche se da una parte ha permesso di allargare le conoscenze rilevando, per esempio, la presenza di sostanze coloranti prima non accertate, ha tuttavia fatto sorgere incertezze e dubbi circa l'impiego delle tecniche precedenti mettendo di nuovo in discussione anche quei risultati che venivano ormai accettati come definitivamente acquisiti.

Così, per esempio, tutte le identificazioni di antocianine basate sul preventivo loro isolamento mediante precipitazione con acetato di piombo, devono essere ritenute quanto mai incerte ed incomplete attualmente dopo i lavori di Deibner e Bourzeix (18) e di Hayashi (24).

Nei vini rossi in generale è stata accertata la presenza di derivati glucosidici (mono e di) e di derivati acilati di cinque antocianidine (agliconi): cianidina, delfinidina, petunidina, peonidina, malvidina. La

loro distribuzione quantitativa e la loro presenza varia a secondo dei vitigni da cui provengono i vini. I vini fatti con uve di *Vitis vinifera,* secondo molti autori (5, 6, 7, 11, 12, 13, 33, 34, 35, 36), si differenzierebbero dai vini fatti con uve di ibridi produttori diretti o perchè (a) sono privi o quasi di diglucosidi antocianici in genere, oppure perchè (b) sono privi non di diglucosidi antocianici bensì soltanto del 3-5-diglucoside malvidinico. In altre parole le uve americane o euro-americane sarebbero caratterizzate o dalla prevalenza, o quasi, di antociani diglucosidi (come sembrava dalle prime ricerche di Ribéreau-Gayon) oppure soltanto dalla presenza del 3-5-diglucoside della malvidina.

Non mancano però lavori i cui risultati hanno fatto sorgere dei dubbi sulla validità di tali asserzioni.

Biol e Michel (7) (9), lavorando su un gruppo di vini di *Vitis vinifera* e di vini di viti ibride euro-americane, avrebbero accertato che il malvidin-diglucoside — ritenuto presente soltanto nelle uve euro-americane e perciò caratteristico di esse — non è invece costantemente presente in esse: su 37 campioni di vini provenienti da viti ibride otto sarebbero risultati privi di malvidin-diglucoside. Questo confermerebbe quanto riscontrato precedentemente anche da Ribéreau-Gayon e Sudraud (1957).

Perciò l'accertata assenza del malvidin-diglucoside in un vino non dovrebbe far concludere sulla sicura assenza di uve ibride nel vino esaminato.

Resterebbe sempre valida la situazione inversa: la malvina in un vino denuncerebbe con certezza la presenza di uve ibride.

Già lo stesso Ribéreau-Gayon (1955) (42) aveva trovato, impiegando una tecnica cromatografica bidimensionale anzichè monodimensionale, tracce del diglucoside della malvidina anche in alcuni vini di *Vitis vinifera.*

Più recentemente (1964) Pifferi e Zamorani (32), usando anch'essi una tecnica cromatografica bidimensionale, avrebbero accertata la presenza di malvina in un vino Merlot *(V. vinifera).* Secondo questi Autori « l'anidride solforosa potrebbe provocare una maggiore solubilizzazione selettiva dei diglucosidi. Conseguenza più rilevante di questo fatto sarebbe la comparsa di quantità apprezzabili di diglucosidi di malvidina, petunidina e delfinidina ».

Sempre impiegando una tecnica cromatografica bidimensionale, anche Tirdea e Tirdea (1963) (40) avrebbero accertata la presenza di malvina in alcune varietà rumene di *Vitis vinifera.*

Sembra quindi che allo stato attuale delle conoscenze non sia ancora lecito poter concludere con assoluta certezza sulla assenza della malvina nella « *vinifera* » e ciò sia per l'insufficienza di specifici studi che dovrebbero essere condotti su un gran numero di vitigni, sia anche per l'incompletezza delle tecniche finora impiegate.

A proposito delle imperfezioni analitiche si deve rilevare come alla possibilità di errori analitici dovuta alle difettose tecniche di separazione chimica preventiva dei glucosidi — di cui è stato fatto cenno in precedenza — sia da aggiungere anche la difficoltosa separazione cromatografica della malvina dalla peonina specialmente quando — come nei casi qui considerati — i due diglucosidi possono trovarsi contemporaneamente presenti in quantità relative molto diverse.

Nulla vieta poi di ritenere che certi antociani, contenuti in piccole quantità nel frutto, passino nel vino soltanto in determinate condizioni di vinificazione: i risultati delle ricerche dei già citati Pifferi e Zamorani (32) porterebbero anzi a dar valore di reale possibilità a questa supposizione [1]). Nè, per ora, tale supposizione potrebbe essere negata dalle conoscenze che si hanno sui pigmenti dell'uva: troppo scarsi infatti risultano ancora gli studi analitici rivolti, non alla composizione antocianica dei vini, ma direttamente a quella delle uve.

Ancor più scarsi e limitati risultano i dati riguardanti altri organi della pianta di vite e, per di più, quei pochi dati esistenti sono spesso fra loro contrastanti [2]). Se non molto ancora si sa sulla genetica del chimismo dei pigmenti del genere *Vitis* [3]) ancor meno si conosce sui fattori fisiologici che nella vite intervengono nella biosintesi dei pigmenti e che passando a stati patologici e subpatologici, possono in qualche modo causare alterazioni dei meccanismi di sintesi.

Quale può essere il significato chimico-genetico dell'acilazione delle antocianine, dei copigmenti di natura flavonoide [4]), delle leucoantocianine? Quale sarà l'effetto della loro presenza sul comportamento cromatografico delle antocianine?

Non mancano Autori che ritengono che le leucoantocianine possano fungere da precursori di antocianine. D'altra parte altri Autori invece, basandosi su evidenze genetiche, negano una qualsiasi diretta dipendenza fra leucoantocianine e antocianine (4, 10, 15, 24, 27, 28, 37, 38, 39).

Per riscaldamento in ambiente acido le leucoantocianine hanno la proprietà di trasformarsi in antocianidine colorate, estraibili dall'alcool isoamilico (2) (3). Le antocianidine che di norma si ottengono dalle leucoantocianine sono la cianidina, con netto predominio, e la delfinidina.

---

[1]) Kuttelvaser, Z., (Coloring matter in grapes and its changes during wine production). Krasny prumysl. 6, 133-137, 1960. In Chem. Abst., 54:25550 i, 1960.

[2]) Nutsubidze, N.N., Gulbani, D.J., (Anthocyanins in the leaves of grapes wines). Soobshcheniya Akad. Nauk Gruzin, S.S.R., 23, 671-676, 1959. In Chem. Abst. 54:25070 f, 1960.

[3]) Sulla genetica della malvina nel genere *Vitis* recentemente (1964) è stato pubblicato un pregevole lavoro di Cappelleri, Calò e Liuni (14).

[4]) In collaborazione col Prof. Candussio dell'Istituto Chimico Agrario Sperimentale di Gorizia sono in corso ricerche sui composti flavonici nelle uve e nella vite.

Bate-Smith (2) e Bate-Smith e Lerner (3) hanno riscontrato in molte piante la presenza di peonidina derivata da leucoantociani. La leucopeonidina è stata poi messa in evidenza da Ribéreau-Gayon (33) [1].

Considerati dal punto di vista chimico-enologico i leucoantociani rivestono un innegabile interesse essendo stato più volte (1) (36) dimostrato che essi possono essere responsabili dell'aumento di colore dei vini durante il primo periodo dopo la vinificazione.

* * *

Le indagini da noi iniziate vogliono portare dei contributi alle conoscenze della composizione dei pigmenti delle viti, e dei vini da essi derivati, conoscenze che possono riuscire di utilità nei vari campi di applicazioni agrarie (genetica, chimica enologica, ecc.).

I risultati delle prime ricerche finora eseguite vengono illustrati in questa nota e riguardano:

1) differenziazione qualitativa di antocianidine e leucoantocianidine nelle foglie e negli acini durante il ciclo vegetativo annuale della vite;

2) confronto fra le antocianidine delle foglie e degli acini di alcuni vitigni a uva rossa all'epoca della vendemmia;

3) presenza (separazione e identificazione) dei diglucosidi malvina e peonina nelle foglie e negli acini di vite all'epoca della vendemmia.

I criteri dei prelevamenti, le modalità di preparazione dei campioni, i metodi analitici impiegati, vengono descritti nella trattazione di ciascuna indagine.

Antocianine e leucoantocianine durante il ciclo vegetativo della vite

Per i campionamenti sono state scelte alcune piante, per ciascuno dei tre vitigni presi in considerazione, in un vigneto misto di vecchio impianto e coltivato su terreno alluvionale sabbio-calcareo. La scelta dei vitigni è stata basata sul criterio di poter effettuare un confronto fra la vite euro-americana (Baco) e la vite europea (Merlot) e nel gruppo delle viti europee, fra un vitigno a uva rossa (Merlot) e un vitigno a uva bianca (Chasselas). Col campionamento eseguito in uno stesso vigneto si è inteso di evitare qualsiasi eventuale variazione dovuta a fattori pedo-climatici nella composizione antocianica.

---

[1]) Secondo Swain (37) e Harborne (28) però non esisterebbero in natura leucoantocianine metilate.

DESCRIZIONE SCHEMATICA DEI CAMPIONI

	Campionamento di primavera (maggio)	Campionamento d'estate (luglio-agosto)		Campionamento d'autunno (settembre-ottobre)	
	foglie	foglie	acini	foglie	acini
Vite europea, uva rossa (Merlot) . .	di colore verde con sfumature rosse, non mature (5 maggio)	di colore verde intenso, normali (5 agosto)	verdi (5 agosto)	di colore verde cupo alquanto rinsecchite (2 ottobre)	rosso-scuro
Vite euro-americana, uva rossa (Baco)	di colore verde con sfumature rosse, non mature (5 maggio)	di colore verde intenso, normali (20 luglio)	verdi (20 luglio)	di colore verde-giallastro (10 settembre)	rosso-scuro
Vite europea, uva bianca (Chasselas) .	di colore bronzo e verde-chiaro, non mature (5 maggio)	di colore verde intenso, normali (5 agosto)	verdi (5 agosto)	di colore verde-pallido, alquanto rinsecchite (10 settembre)	verde-giallo dorato

Le foglie sono state campionate in tre epoche: in primavera (primi di maggio) sono state raccolte foglie giovani ancora in via di sviluppo; in estate (luglio-agosto) foglie di recente maturazione; in autunno (settembre-ottobre) foglie già vecchie.

Gli acini sono stati prelevati nelle ultime due epoche di campionamento delle foglie e cioé: in estate (acini completamente sviluppati, a invaiatura non ancora iniziata); in autunno (alla vendemmia, acini maturi).

I campioni sono schematicamente descritti nel Prospetto 1.

L'estrazione delle antocianine è stata eseguita, con alcol metilico contenente l'1% di HCl, sempre sul materiale fresco tritato in mortaio, fino a esaurimento del colore.

Negli acini l'estrazione è stata effettuata separatamente, su bucce e vinaccioli. La polpa, incolora, non è stata presa in considerazione ed è stata scartata. I vinaccioli, prima dell'estrazione sono stati ben frantumati in mortaio.

Nel caso di materiale verde (foglie, acini non maturi) la clorofilla estratta è stata eliminata operando il lavaggio dell'estratto con etere di petrolio (25). Per l'isolamento e la purificazione delle antocianine è stata adottata la doppia precipitazione con acetato neutro di piombo secondo la tecnica di Diemar-Sengewald modificata da Biol-Michel (6) (20) (31) [1]).

Le antocianine estratte dai campioni di foglie e di acini non maturi sono risultate presenti in quantità talmente esigue da rendere assai problematica la loro identificazione che non è stata perciò eseguita e temporaneamente rimandata a una successiva indagine. La possibilità di concentrare senza perdite eccessive le soluzioni degli agliconi ottenuti per idrolisi acida delle antocianine ha facilitato invece la separazione e la identificazione delle antocianidine.

Le quantità di leucoantocianidine estratte, previa idrolisi acida, sia dalle foglie che dagli acini a qualsiasi stadio di sviluppo, sono state sempre relativamente piuttosto rilevanti e tali da permettere una loro buona separazione e identificazione.

---

[1]) Secondo Deibner e Bourzeix (18) le varie tecniche di precipitazione con l'estratto di Pb neutro o basico devono essere impiegate con grande discernimento specialmente quando si vuol isolare gli antociani quantitativamente evitando contemporaneamente eventuali modificazioni della loro struttura molecolare. Secondo gli stessi Autori l'integrità molecolare è sicuramente rispettata dal trattamento precipitante per i diglucosidi ma non altrettanto sicuramente per i monoglucosidi e gli agliconi. Secondo Hayashi (24) i gruppi ossidrilici liberi adiacenti nelle molecole dell'antocianina sembrano favorire la formazione di sali di piombo insolubili; i glucosidi della cianidina e della delfinidina vengono precipitati quantitativamente da questi reattivi, mentre i derivati della pelargonidina, peonidina e malvidina danno una precipitazione incompleta. Le perdite e le trasformazioni che possono avvenire

Le antocianidine sono state separate cromatograficamente su carta (Whatman n. 3), solvente « Forestal » (Ac. acetico-HCl conc.-acqua, 30:3:10], metodo monodimensionale discendente) e identificate sia mediante l'Rf sia per confronto diretto con antocianidine cromatograficamente pure [1]).

La valutazione quantitativa è molto approssimativa essendo essa stata eseguita per confronto visivo diretto fra le macchie tenendo in considerazione la loro relativa grandezza e l'intensità di colorazione.

I risultati delle analisi cromatografiche sono riportati nel prospetto 2 per quanto riguarda le antocianidine derivate da antocianine e nel Prospetto 3 per quanto si riferisce alle antocianidine derivate da leucoantocianine.

Antocianidine da antocianine.

Foglie. In tutti e tre i vitigni sono presenti antocianine unicamente

---

risultano quindi di difficile valutazione e sono particolarmente forti quando le varie purificazioni vengono applicate a estratti di foglie.

Le tecniche di precipitazione possono risultare particolarmente utili quando, nelle ricerche qualitative sugli antociani, si vuol ottenere la separazione di certi diglucosidi, presenti solo in piccole quantità, aumentandone le quantità disponibili per un loro ulteriore studio.

Sulle foglie primaverili dei tre vitigni scelti per le nostre ricerche la identificazione e la valutazione quantitativa degli agliconi, derivati dalle antocianine precipitate con acetato basico di piombo, sono state eseguite separatamente sulla prima e sulla seconda precipitazione. I risultati, riportati nel Prospetto che segue, hanno confermato quanto è stato rilevato dagli Autori dianzi citati.

ANTOCIANIDINE DA ANTOCIANINE PRECIPITATE CON ACETO BASICO DI Pb DAGLI ESTRATTI DI FOGLIE PRIMAVERILI

Agliconi	Rf (Forestal)	Baco		Merlot		Chasselas	
		1ª precip.	2ª precip.	1ª precip.	2ª precip.	1ª precip.	2ª precip.
Delfinidina . .	0.32	2+	—	1 +	—	2 +	—
Cianidina . .	0.49	4+	2 +	2 +	2 +	3 +	2 +
Peonidina . .	0.63	1+	2 +	1 +	1 +	2 +	2 +

[1]) La delfinidina è stata ottenuta dai sepali di Hydrangea hortensis cvr. a fiore rosa scuro; la cianidina dalle foglie di Prunus Pissardi; la malvidina dai petali di Malva silvestris; la peonidina dai petali di Paeonia sinensis cvr. a fiore rosso cupo.

Sono state anche impiegate, con uguale risultato, la malvidina e la cianidina fornite dalla ditta svizzera Fluka.

ANTOCIANIDINE
(derivate da antocianine)

	Rf medio in solv. Forestal	Vite euro-americana rossa (Baco)							Vite europea, uva rossa (Merlot)							Vite europea, uva bianca Chasselas)						
		foglie			bucce		semi		foglie			bucce		semi		foglie			bucce		semi	
		primaverili	estive	autunnali	acini verdi	acini maturi	acini verdi	acini maturi	primaverili	estive	autunnali	acini verdi	acini maturi	acini verdi	acini maturi	primaverili	estive	autunnali	acini verdi	acini maturi	acini verdi	acini maturi
Delfinidina . .	0.33	2 +	—	—	—	4 +	—	—	1 +	—	—	—	3 +	—	—	2 +	—	—	—	—	—	—
Petunidina . .	0 46	—	—	—	—	3 +	—	—	—	—	—	—	3 +	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cianidina . .	0.50	6 +	—	—	—	tr (?)	—	—	4 +	—	—	—	tr (?)	—	—	5 +	—	—	—	—	—	—
Malvidina . .	0.60	—	—	—	—	9 +	—	—	—	—	—	—	8 +	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Peonidina . .	0 63	3 +	—	—	—	4 +	—	—	2 +	—	—	—	2 +	—	—	4 +	—	—	—	—	—	—
Pigmento rosso non identificato . .	0.77	—	—	—	—	3 +	—	—	—	—	—	—	3 +	—	—	—	—	—	—	—	—	—

nelle foglie giovani di primavera colorate con sfumature rosse non molto intense. Mancano gli antociani sia nelle foglie d'estate che in quelle autunnali.

Le antocianine presenti sono costituite, in tutti e tre i vitigni, da delfinidina, cianidina e peonidina.

Quantitativamente predomina sempre la cianidina, segue la peonidina e infine la delfinidina.

Le foglie di Merlot avevano un contenuto di pigmenti antocianici minori di quello del Baco e del Chasselas (vite a uva bianca).

Bucce. Sono presenti antociani soltanto nelle bucce degli acini maturi delle viti a uva rossa (Merlot e Baco). Mancano negli acini verdi di tutti e tre i vitigni. Mancano negli acini maturi del Chasselas (uva bianca).

Le antocianidine sono costituite, sia nel Merlot che nel Baco, da: malvidina, delfinidina, peonidina, petunidina, cianidina (?). Predomina quantitativamente la malvidina. È dubbia la presenza di cianidina.

È inoltre ben evidente e costante la presenza di un pigmento rosso, non identificato, a Rf 0.77.

Le bucce dei due vitigni contengono le stesse antocianidine presenti in quantità all'incirca uguali.

Semi. Nei vinaccioli dei tre vitigni gli antociani sono risultati sempre praticamente assenti o presenti in tracce.

Nelle foglie l'antocianidina predominante è la cianidina che invece sparisce quasi del tutto nel frutto. Permane la presenza sia nelle foglie che nei frutti di delfinidina e di peonidina. Nei frutti appaiono petunidina e malvidina (quest'ultima in quantità relativamente rilevanti) che sono invece assenti nelle foglie.

*Leucoantocianidine *) da leucoantocianine.*

Foglie. Nelle foglie dei tre vitigni considerati, a qualsiasi stadio di maturità, sono sempre presenti leucoantocianine. Le leucoantocianine per idrolisi acida, hanno fornito: leucodelfinidina, leucocianidina, e leucopeonidina.

La leucopeonidina è però risultata assente nelle foglie primaverili dei due vitigni a uva rossa. Con l'avanzare della maturità delle foglie la leucodelfinidina diminuisce e aumenta invece la leucopeonidina. La leucocianidina aumenta nei due vitigni a uva rossa e diminuisce nel vitigno a uva bianca.

---

*) Vengono qui denominate leucoantocianidine le antocianidine derivate, per idrolisi acida e a caldo, dalle leucoantocianine per distinguerle dalle antocianidine derivate invece da antociani. Chimicamente la distinzione non ha significato in quanto la loro costituzione molecolare è la stessa e le modalità della loro determinazione qualitativa è pure la stessa.

LEUCOANTOCIANIDINE
(derivate da leucoantocianine)

	Rf medio in solv. Forestal	Vite euro-americana, uva rossa (Baco)							Vite europea, uva rossa (Merlot)							Vite europea, uva bianca (Chasselas)						
		foglie			bucce		semi		foglie			bucce		semi		foglie			bucce		semi	
		primaverili	estive	autunnali	acini verdi	acini maturi	acini verdi	acini maturi	primaverili	estive	autunnali	acini verdi	acini maturi	acini verdi	acini maturi	primaverili	estive	autunnali	acini verdi	acini maturi	acini verdi	acini maturi
Leucodelfinidina .	0.33	3 +	1 +	1 +	1 +	?	tr (?)	tr (?)	4 +	3 +	3 +	1 +	?	tr (?)	tr (?)	6 +	4 +	4 +	2 +	2 +	tr (?)	tr (?)
Leucocianidina .	0.50	1 +	3 +	3 +	3 +	?	2 +	2 +	3 +	5 +	5 +	3 +	?	4 +	4 +	10 +	6 +	6 +	3 +	3 +	5 +	5 +
Leucopeonidina .	0.63	—	1 +	2 +	1 +	?	—	—	—	2 +	3 +	tr. (?)	?	—	—	1 +	4 +	4 +	1 +	1 +	—	—
Pigmento rosso non identificato	0.77	2 +	1 +	1 +	1 +	?	tr (?)	tr (?)	2 +	2 +	2 +	1 +	?	tr (?)	tr (?)	3 +	2 +	2 +	1 +	1 +	tr (?)	tr (?)

È risultato impossibile determinare separatamente l'eventuale presenza di leucoantocianidine nelle bucce degli acini maturi di uva rossa data la fortissima presenza di antocianidine da antocianine.

La leucocianidina predomina sempre quantitativamente sulle altre leucoantocianidine.

Confrontando i risultati ottenuti nei diversi vitigni si osserva che: le foglie del Chasselas (a uva bianca) sono sempre molto più ricche di leucoantocianidine che non quelle dei due vitigni a uva rossa. Inoltre nelle foglie di primavera del Chasselas è presente la leucopeonidina che è invece assente nelle foglie primaverili degli altri due vitigni. Fra questi ultimi, le foglie del Merlot contengono sempre quantità maggiori di leucoantocianidine.

Nelle foglie è sempre presente un pigmento rosso non identificato a Rf 0.77: lo stesso pigmento (aglicone) è stato rilevato anche nelle antocianine.

Bucce. Nelle bucce degli acini verdi di tutti e tre i vitigni sono risultate presenti leucoantocianine che diminuiscono poi alla maturità del frutto nei vitigni a uva rossa e permangono invece, e all'incirca nelle stesse quantità, negli acini maturi dell'uva bianca.

Le leucoantocianine delle bucce hanno la stessa composizione delle leucoantocianine delle foglie: leucocianidina (in quantità maggiore), leucodelfinidina, leucopeonidina e il pigmento rosso non identificato a Rf 0.77.

Le quantità di leucoantocianidine presenti nelle bucce degli acini verdi sono all'incirca le stesse nei tre vitigni.

Semi. I vinaccioli contengono sempre leucoantocianine che, per idrolisi acida, hanno fornito esclusivamente leucocianidina. Molto dubbiosa è risultata la presenza di leucodelfinidina.

Le quantità di leucocianidina non variano con la maturità dei semi.

I semi più forniti di leucoantocianine sono quelli di Chasselas; seguono quelli di Merlot e infine quelli di Baco [1]).

---

[1]) Considerata la relativa ricchezza di leucoantociani dei semi si è voluto provare se gli stessi leucoantociani possano essere ceduti al vino in determinate circostane.

A tal scopo a 50 cc di vino sono stati aggiunti g 2 di vinaccioli frantumati. Dopo un contatto di tre giorni il vino, previa filtrazione, è stato sottoposto a un trattamento idrolizzante acido a caldo. La stessa idrolisi è stata fatta sul vino senza l'aggiunta dei vinaccioli.

Le quantità di antocianidine, espresse in mg/litro di rosso Congo, ottenute dalle leucoantocianine sono risultate le seguenti:

Vino Pinot grigio:	
con aggiunta di vinaccioli (di Pinot grigio)	29.0
senza aggiunta di vinaccioli	2.8
Differenza in più	26.2
Vino Chasselas:	
con aggiunta di vinaccioli (di Chasselas)	52.0
senza aggiunta di vinaccioli	4.6
Differenza in più	47.4

Le leucoantocianine sono risultate diffusamente presenti nei tre vitigni qui considerati e sempre in quantità relativamente considerevoli.

Degno di rilievo è il diverso comportamento dei tre vitigni nei riguardi delle variazioni quantitative delle leucoantocianine in relazione al ciclo vegetativo delle piante: con l'avanzare della stagione e della maturità delle piante nei due vitigni a uve rosse (Merlot e Baco) le leucoantocianine aumentano nelle foglie e diminuiscono nelle bucce, viceversa nel Chasselas (vite a uva bianca) le leucoantocianine diminuiscono nelle foglie e permangono costanti nelle bucce.

Le leucoantocianine per idrolisi acida hanno fornito in predominanza leucocianidina: sono presenti però, in quantità molto minori, anche leucodelfinidina e leucopeonidina.

Confronto fra le antocianidine delle foglie e degli acini all'epoca della vendemmia

Sono stati presi in considerazione i seguenti vitigni: Baco (vite euro-americana, a uva rossa), Merlot (vite europea, a uva rossa), Refosco (vite europea, a uva rossa), Pinot rosso (vite europea, a uva rossa).

Per i campionamenti sono state scelte piante con grappoli perfettamente sani e maturi e con foglie presentanti intensi e diffusi arrossamenti.

La preparazione dei campioni (foglie, bucce), le estrazioni, le purificazioni, l'idrolisi acida e le determinazioni cromatografiche, sono state eseguite con le stesse modalità già in precedenza descritte.

I risultati sono riportati nel Prospetto 4.

La delfinidina e la peonidina sono sempre presenti sia nelle foglie che nei frutti.

La petunidina e la malvidina mancano nelle foglie.

La cianidina è sempre presente e in quantità notevoli nelle foglie; si trova invece in piccolissime quantità o può anche mancare nei frutti.

Le quantità di delfinidina presenti nelle foglie sono proporzionalmente minori di quelle presenti nelle bucce, nei vitigni Baco, Merlot e Refosco. La situazione si inverte nel Pinot rosso.

La peonidina nelle bucce di Baco si trova sempre in quantità maggiori che non nelle bucce degli altri tre vitigni esaminati.

Nelle foglie l'antocianidina maggiormente rappresentata è la cianidina; nelle bucce invece è la malvidina.

È presente, sia nelle foglie che nelle bucce di tutti i vitigni esaminati, un pigmento rosso a Rf 0.77 che non è stato identificato.

Antocianidine estratte da acini maturi e da foglie arrossate all'epoca della vendemmia

	Rf medio solv. Forestal	Baco		Merlot		Refosco		Pinot rosso	
		foglie	bucce	foglie	bucce	foglie	bucce	foglie	bucce
Delfinidina	0.32	5 +	8 +	5 +	5 +	5 +	7 +	7 +	4 +
Petunidina	0.46	—	3 +	—	3 +	—	3 +	—	3 +
Cianidina	0.49	10 +	1 +	8 +	?	5 +	1 +	9 +	?
Malvidina	0.60	?	9 +	—	3 +	—	8 +	—	7 +
Peonidina	0.63	6 +	3 +	5 +	1 +	3 +	2 +	6 +	1 +
Pigmento rosso non identificato . . .	0.77	2 +	3 +	2 +	2 +	1 +	3 +	2 +	2 +

Ricerca della malvina e della peonina negli acini e nelle foglie all'epoca della vendemmia

La ricerca della malvina (3,5 malvidindiglucoside) e della peonina (3,5 peonidindiglucoside) è stata fatta sui campioni di bucce (acini maturi) e di foglie (autunnali arrossate) di cui è stato trattato al precedente paragrafo. I campioni provenivano perciò dai vitigni: Baco, Merlot, Refosco, Pinot rosso. La ricerca riveste una particolare importanza in quanto che la loro presenza nella *Vitis vinifera* non è ammessa da molti ricercatori o, almeno, è ancora molto dubbiosa. I due diglucosidi sono invece generalmente presenti, in quantità più o meno rilevanti, nei vitigni americani o euro-americani.

Queste due antocianine, l'una separata dall'altra, sono facilmente distinguibili per la loro diversa fluorescenza alla luce UV (colore rosso-mattone per la malvina, colore aranciato per la peonina) e per il loro diverso comportamento con certi reattivi (per es. in presenza di vapori ammoniacali la peonina diventa rosso ciliegia e la malvina diventa rosso violetta). Sorgono invece difficoltà nel riconoscimento quando i due diglucosidi si trovano uno in presenza dell'altro e in quantità relative assai diverse.

Nelle nostre ricerche con le tecniche cromatografiche monodimensionali, sia ascendenti che discendenti, eseguite con solvendi diversi 1) acol butilico normale - ac. acetico - acqua (4:1:5) fase organica; 2) come il precedente, ma fase acquosa; 3) alcol butilico normale - ac. cloridrico 2N (1:1); 4) tampone fosforico di Britton-Robinson) non abbiamo mai ottenuto una separazione veramente soddisfacente dei due diglucosidi nè una sicura loro identificazione mediante gli Rf o mediante il confronto diretto con le due antocianine estratte dai petali di malva e di peonia e purificate cromatograficamente. Le macchie della peonina e della malvina sono sempre vicinissime e difficilmente discernibili. Cromatografate separatamente, la peonina presenta in solvente organico un Rf leggermente superiore a quello della malvina, viceversa in solvente non organico l'Rf della peonina risulta leggermente inferiore. La differenza, come riportato da Hayashi (24), è in ogni caso molto piccola e assolutamente insufficiente per la identificazione dei due antociani in special modo se sono riuniti (Cfr. fig. 1, 2, 3 e 4).

Con le tecniche bidimensionali, sia ascendenti che discendenti, sono state ottenute macchie meno raccolte, relativamente alle tecniche monodimensionali, tuttavia identificabili ripetendo più volte lo sviluppo e l'osservazione delle variazioni in seguito al trattamento con vari reattivi.

Nella cromatografia bidimensionale con carta Whatman n. 1 usando la fase acquosa del solvente butanolo normale - ac. acetico - acqua (4:1:5) nella prima direzione e la fase organica dello stesso solvente nella seconda direzione si è ottenuta una discreta separazione della malvina dalla peonina. Com'è stato rilevato anche da Biol e Foulonneau (8) la peonina si sposta leggermente in alto e a destra rispetto alla malvina (fig. 5). Esponendo la cromatografia alla luce UV si riesce a distinguere la fluorescenza aranciata della peonina da quella rosso - mattone della malvina.

È stata provata anche la separazione della malvina dalla peonina per mezzo della cromatografia su strato sottile di gel di silice usando la tecnica bidimensionale con la fase organica del solvente butanolo normale - ac. acetico - acqua (4:1:5) per tutte e due le direzioni. Le due antocianine si distanziano un po' più nettamente che non nella cromatografia su carta però l'osservazione alla luce UV non dà alcun

buon risultato. Ottima invece è risultata l'osservazione dei cambiamenti di colore delle macchie delle due antocianine alla loro esposizione a vapori di acido cloridrico e a vapori di ammoniaca.

Le antocianine, estratte dalle bucce di Baco, Merlot, Refosco e Pinot rosso mediante alcol metilico contenente l'1% di HCl sono state prima separate per precipitazione con acetato basico di Pb in ambiente ammoniacale, quindi ridisciolte e purificate per precipitazione con etere (per tre volte).

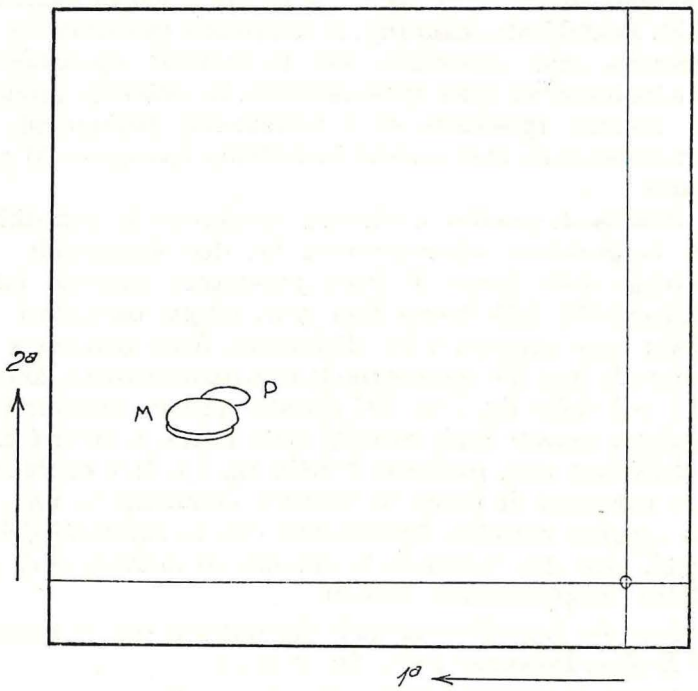

Fig. 5 - Separazione della peonina dalla malvina per cromatografia bidimensionale su carta.
1ª direzione: fase inferiore del solvente Bu-HAc.-H_2O
2ª direzione: fase superiore del solvente Bu-HAc.-H_2O

Sono state provate anche altre tecniche di purificazione: a) per precipitazione diretta con etere (per tre volte) operando sulla sostanza secca; b) per precipitazione con acetato di Pb neutro secondo il procedimento di Rentschler e di Diemar-Sengebald modificato da Biol e

---

[1]) Con solvente organico l'Rf della peonina e della malvina è ritenuto uguale da diversi Autori (22) (25) mentre Zamorani e Pifferi (42) riportano con Bu-HAc-H_2O i seguenti valori: malvidin-diglucoside Rf = 0.18 peonidin-diglucoside Rf = 0.24.

Michel (6) (20) (3); c) per separazione con carbone decolorante secondo la tecnica riportata da Cappelleri (2) (4) operando sull'estratto ottenuto con alcool etilico diluito. I migliori risultati sono stati sempre ottenuti con la tecnica da noi adottata.

Cromatografia monodimensionale discendente con la fase organica del solvente butanolo normale - acido acetico - acqua (4:1:5) (cfr. fig. 1 e 2).

Dalle fotografie delle figure 1 e 2 si rileva che la peonina (posizione 4) presenta un Rf leggermente superiore a quello della malvina (posizione 5). In ambiente acido (fig. 1) la peonina (posizione 4) assume una fluorescenza color aranciato; per la malvina (posizione 5) la fluorescenza ha invece un color rosso-mattone. In ambiente ammoniacale (fig. 2) la peonina (posizione 4) è nettamente distinguibile perchè assume una colorazione rosa mentre la malvina (posizione 5) passa al violetto scuro.

Nella miscela di peonina e malvina (posizione 6) con difficoltà è discernibile la presenza contemporanea dei due diglucosidi.

Gli estratti delle bucce di Baco presentano notevoli differenze rispetto agli estratti delle bucce degli altri vitigni esaminati.

Nel Baco sono presenti i 3-5 diglucosidi della malvidina e della peonidina che alla luce UV presentano la loro caratteristica fluorescenza (posizione 1 e 3 della fig. 1 et 2). Queste macchie fluorescenti sono sempre risultate assenti negli estratti delle bucce di tutti i campioni esaminati di Merlot (cfr. posizione 2 della fig. 1 e 2) e di Pinot rosso.

Dei tre campioni di bucce di Refosco esaminati in uno è stata notata una leggera macchia fluorescente con le caratteristiche della peonina, negli altri due campioni le macchie di malvina e di peonina sono risultate completamente assenti.

Cromatografia monodimensionale discendente con il tampone fosforico di Britton-Robinson (cfr. fig. 3 e 4).

Al contrario di quanto è stato osservato nella cromatografia con solvente organico (Bu-HAc-H_2O) la peonina presenta qui un Rf leggermente inferiore a quello della malvina [1]). La determinazione degli Rf risulta però assai incerta essendo le macchie poco raccolte (posizione 4, 5 e 6). La miscela di peonina e malvina costituisce praticamente una macchia unica (posizione 6) in cui sono quasi indistinguibili i due diglucosidi.

Nel cromatogramma esposto ai vapori ammoniacali è ben visibile la peonina quando è pura (posizione 4 della fig. 4). I vapori ammoniacali rendono più evidente la diversa colorazione della peonina che però

---

[1]) Secondo Biol e Foulonneau (8) con il solvente di Britton-Robinson i due diglucosidi presentano praticamente lo stesso Rf. Zamorani e Pifferi (42) riportano con il solvente H_2O-HAc.-HCl 12 N i seguenti valori: malvidin-diglucoside Rf = 0.47 Peonidin-diglucoside Rf = 0.45.

risulta sempre difficilmente distinguibile in presenza di malvina. Con il solvente di Britton-Robinson risulta evidente uno sdoppiamento della malvina: il fenomeno è stato rilevato sia con la malvina da noi estratta dai petali della Malva silvestris sia con la malvina fornita dalla Ditta Fluka.

Nel Merlot (posizione 2 della fig. 4) e nel Refosco, coi vapori ammoniacali compaiono macchie fluorescenti dovute a diversi composti flavonoidi.

Nella cromatografia bidimensionale discendente [1]) eseguita col solvente Bu-H Ac.-H_2O nelle due direzioni (la fase acquosa nella 1ª e la fase organica nella 2ª direzione) le bucce di Baco presentano differenze notevoli, rispetto a quelle degli altri vitigni esaminati, nel tipo e nel numero delle macchie.

Nel Baco predominano i diglucosidi fra i quali si trovano in quantità sensibilmente elevate anche i 3-5 diglucosidi della peonidina e della malvidina.

Questi due diglucosidi sono distinguibili sul cromatogramma di Baco sia per la loro posizione, sia per la loro diversa fluorescenza alla luce UV, sia ancora per la loro diversa colorazione alle variazioni di pH.

Negli estratti di tutti i campioni di Baco è stata rilevata la presenza di una macchia fluorescente, color lilla, di una antocianina non identificata con Rf più basso di quello della malvina e della peonina (cfr. fig. 5). La macchia dello stesso pigmento è risultata ben evidente e netta anche nelle bucce di uva della *Vitis Labrusca*, appositamente esaminate, mentre non è mai apparsa nelle bucce dei vitigni europei (Merlot, Pinot rosso e Refosco).

Gli estratti metilici delle foglie, purificati per precipitazione con acetato di Pb e con etere, sono stati cromatografati su carta Whatman n. 1 con il solvente butanolo normale - acido acetico - acqua (4:1:5) impiegando sia la tecnica monodimensionale (discendente) sia la tecnica bidimensionale (discendente) (la fase acquosa del solvente nella 1ª direzione, la fase organica nella 2ª direzione).

Nei cromatogrammi degli estratti delle foglie autunnali di Baco è stato possibile rilevare la presenza, in quantità sensibile, della peonina (macchia fluorescente aranciata) mentre incerta è stata la presenza della malvina (macchia fluorescente rosso-mattone, vicinissima alla macchia della peonina).

Nelle foglie autunnali dei vitigni di *V. vinifera* (Merlot, Pinot rosso, Refosco) non sono state notate le caratteristiche fluorescenze nè della peonina nè della malvina.

---

[1]) La bidimensionale ascendente presenta alcune difficoltà di esecuzione per cui è stata da noi abbandonata.

Incerta — e comunque in quantità molto piccole — è risultata la presenza di peonina nelle foglie primaverili del Baco. Nelle stesse foglie è risultata completamente assente la malvina.

Nel Baco, vitigno ibrido euro-americano, oltre alla malvina è presente anche, ma in quantità molto minore, la peonina. La separazione e identificazione dei due diglucosidi è risultata sempre molto difficoltosa e incerta dato il loro vicinissmo Rf.

Nei vitigni europei (Merlot, Refosco, Pinot rosso) la malvina è risultata sempre assente. Saltuariamente presente, e in ogni caso in quantità molto esigue, è apparsa invece la peonina. La presenza di peonina nelle uve europee, anche se saltuaria, merita di essere confermata con ulteriori indagini giacchè essa, per la difficoltosa sua discriminazione dalla malvina, potrebbe dar luogo a errate interpretazioni delle macchie malvin-simili talvolta segnalate presenti nei cromatogrammi di vini di vitigni europei.

BIBLIOGRAFIA

(1) AMERINE, M.A., CRUESS, W.V., *Technology of wine making*. Westport, Connecticut, The Avi Pubblishing Company Inc. 1960.

(2) BATE-SMITH E.C., *Biochem. J.*, 58, 122-125, 1954.

(3) BATE-SMITH, E.C., LERNER, N.H., *Biochem. J.*, 58, 126-132, 1954.

(4) BATE-SMITH, E.C. in Swain, T. Chemical Plant Taxonomy, Academic Press., London, 1963.

(7) BIOL, H., MICHEL, A., Ann. Technol. Agric., 10, 4, 325-337, 1961.

(7) BIOL, H., MICHEL, A., Ann. Technol. Agric., 4, 339-344, 1961.

(8) BIOL, H., FOULONNEAU, C., Ann. Technol. Agric., 10, 4, 345-350, 1961.

(9) BIOL, H., MICHEL, A., Ann. Technol. Agric., 11, 3, 245, 1962.

(10) BLANK, F., The Botanical Review XII, 5, 1947.

(11) CAPPELLERI, G., Riv. di Vit. e di Enol., 10, 343-348, 1960.

(12) CAPPELLERI, G., Riv. di Vit. e di Enol., 2 43-48, 1963.

(13) CAPPELLERI, G., Riv. di Vit. e di Enol., 4, 165-170, 1964.

(14) CAPPELLERI, G., CALÒ, A., LIUNI, C.S., Riv. di Vitic. e di Enol., 7, 284-302, 1964.

(15) CLARK-LEWIS, J.W. in Geissman, T.A. *The Chemistry of flavonoid compounds*. Pergamon Press, 1962.

(16) COLAGRANDE, O., GRANDI, G., Ann. Sperim. Agr. u.s. vol. XIV, 3, 325-337, 1960.

(17) COLAGRANDE, O., Riv. di Vit. e di Enol. 9, 323-331, 1961.

(18) DEIBNER, L., BOURZEIX, M., Ann. Technol. Agric., 12, 4, 287-312, 1963.

(19) GAROGLIO, P.G., *La nuova enologia*, 2ª Ed., Ist. Ind. Agr., Firenze, 1963.

(20) GAROGLIO, P.G., Riv. di Vit. e di Enol., 6, 187-199, 1962.

(21) GEISSMAN, T.A., in *Modern Methods of plant Analysis*, vol. III, Springer - Verlag, Berlin, 1955.

(22) GEISSMAN, T.A., in *The Chemistry of flavonoid compounds*, Pergamon Press, 1960.

(23) GENTILINI, L., Riv. di Vit. e di Enol., 9, 290-300, 1960.

(24) HAYASHI, J.B., in GEISSMAN, T.A., *The Chemistry of flavonoid compounds*, Pergamon Press, 1962.

(25) HARBORNE, J.B., in Cromatographic Reviews, Ed. by Lederer, vol. I, Elsewier, 1959.
(26) HARBORNE, J.B., in *Pridham J.B. Phenolics in plants in Health and Disease,* Pergamon Press, 1960.
(27) HARBORNE, J.B., in GEISSMAN, T.A., *The Chemistry of flavonoid compounds,* Pergamon Press., 1962.
(28) HARBORNE, J.B., in SWAIN, T., *Chemical Plant Taxonomy,* Accademic Press, London, 1963.
(29) JAULMS, P., NEY, J.M., Ann. Falsif. Expertise Chimique, 616, 180-183, 1960.
(30) MARICHAL, M.M., Ann. Falsif. Fraudes, 568, 155-159, 1956.
(31) PIFFERI, P.G., PAVOLINI, T., Riv. di Vit. e di Enol., 11, 393-406, 1962.
(32) PIFFERI, P.G., ZAMORANI, A., Riv. di Vit. e di Enol., 3, 116-121, 1964.
(33) RIBÉREAU-GAYON, P., Ann. Falsif. Fraudes, 551-552, 436-446, 1954.
(34) RIBÉREAU-GAYON, P., Ann. Falsif. Fraudes, 573-574, 381-387, 1956.
(35) RIBÉREAU-GAYON, P. et PEYNAUD, E., *Analyse et controle des vines,* Librairie Polytechnique Ch. Beranger, Paris et Liege, 1958.
(36) RIBÉREAU-GAYON, P., *Recherches sur les antocyanes des végétaux. Application au genre Vitis. These Doct. ès-sciences physique,* Libraire général de l'Enseignement, Paris, 1959.
(37) SWAIN, T., in PRIDMAN, J.B., *Phenolics* in *Plants in Health and Disease,* Pergamon Press, 1960.
(38) SWAIN, T., in Swain, T., (Ed.), *Chemical Plant Taxonomy,* Academic Press, London, 1963.
(39) SWAIN T. in Geissman, T.A., *The Chemistry of flavonoid compounds.* Pergamon Press. 1962.
(40) TIRDEA, C., TIRDEA, A., *Lucrari stiintifice,* 201, 1963.
(41) VEGER, B., Riv. di Vit. e di Enol., 12, 312-324, 1961.
(42) ZAMORANI, A., PIFFERI, P.G., Riv. di Vit. e di Enol, 2, 85-93, 1964.

RIASSUNTO

La ricerca è stata iniziata con lo scopo di portare un contributo alle conoscenze delle composizioni dei pigmenti delle viti e dei vini da essi derivati.

I risultati di cui si riferisce in questa nota riguardano:

1) differenziazione qualitativa di antocianidine e leucoantocianidine nelle foglie e negli acini durante il ciclo vegetativo annuale della vite;

2) confronto fra le antocianidine delle foglie (autunnali arrossate) e degli acini di alcuni vitigni a uva rossa all'epoca della vendemmia;

3) presenza (separazione e identificazione) dei diglucosidi malvina e peonina nelle foglie (autunnali arrossate) e negli acini di vite all'epoca della vendemmia.

L'antocianidina predominante in generale nelle foglie è la cianidina che invece sparisce quasi completamente nei frutti dove con la maturazione compaiono petunidina e malvidina (quest'ultima in quantità rilevante). Sia nelle foglie che nei frutti si riscontrano poi delfinidina e peonidina mentre petunidina e malvidina risultano praticamente assenti nelle foglie.

Le leucoantocianine per idrolisi acida hanno fornito in predominanza leucocianidina. Sono risultate però presenti, ma in quantità molto minori, anche leucodelfinidina e leucopeonidina.

Sia nelle foglie che nelle bucce di tutti i vitigni è risultato presente un pigmento rosso con Rf 0.77 (in solvente Forestal) che non è stato identificato.

All'epoca della ventemmia negli acini e nelle foglie del Baco, vitigno ibrido euro-americano, oltre alla malvina è presente anche, ma in quantità molto minore, la peonina. Nei vitigni europei (Merlot, Refosco, Pinot rosso) la malvina è risultata sempre assente. Presente in quantità molto esigue e saltuariamente è risultata la peonina.

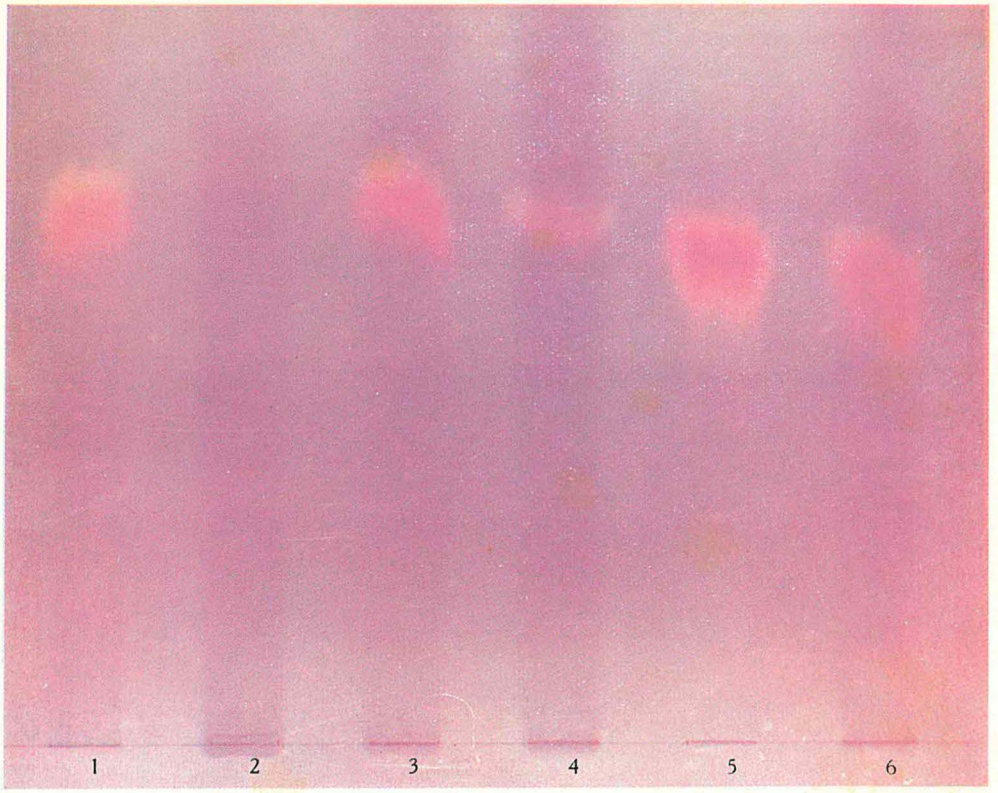

Fig. 1

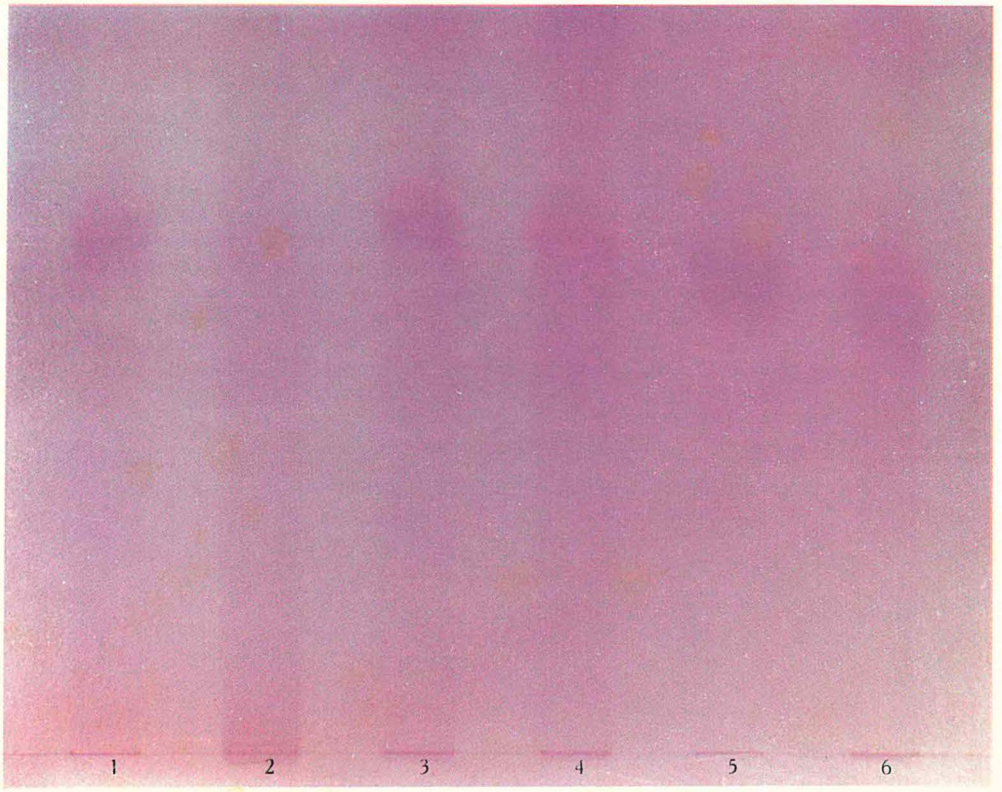

Fig. 2

Cromatografia discendente; carta Whatman n. 1; solvente butanolo normale — acido acetico — acqua (4:1:5), fase organica; durata 12 ore; fronte a 39 cm. Le fotografie, che si riferiscono ai primi 16 cm del cromatogramma, sono state eseguite alla luce ultravioletta (m_{μ} 254), dopo l'esposizione del cromatogramma a vapori cloridrici (fig. 1) e a vapori ammoniacali (fig. 2). L'influenza della diversa intensità della sorgente di luce UV nelle due zone laterali rende meno evidente la differenza delle colorazioni. Disposizioni delle macchie: 1) Baco; 2) Merlot; 3) Merlot + Baco; 4) Peonina; 5) Malvina; 6) Malvina + Peonina. Descrizione dei risultati nel testo.

Fig. 1 - Cromatogramma esposto a vapori cloridrici

Fig. 2 - Cromatogramma esposto a vapori ammoniacali

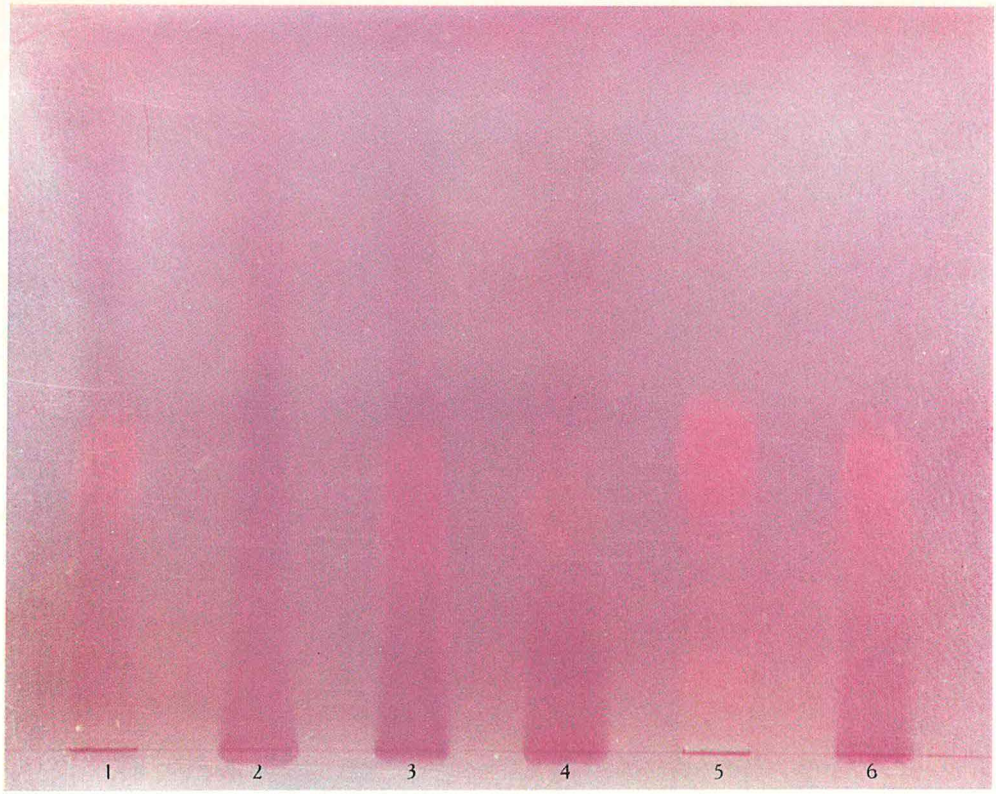

Fig. 3

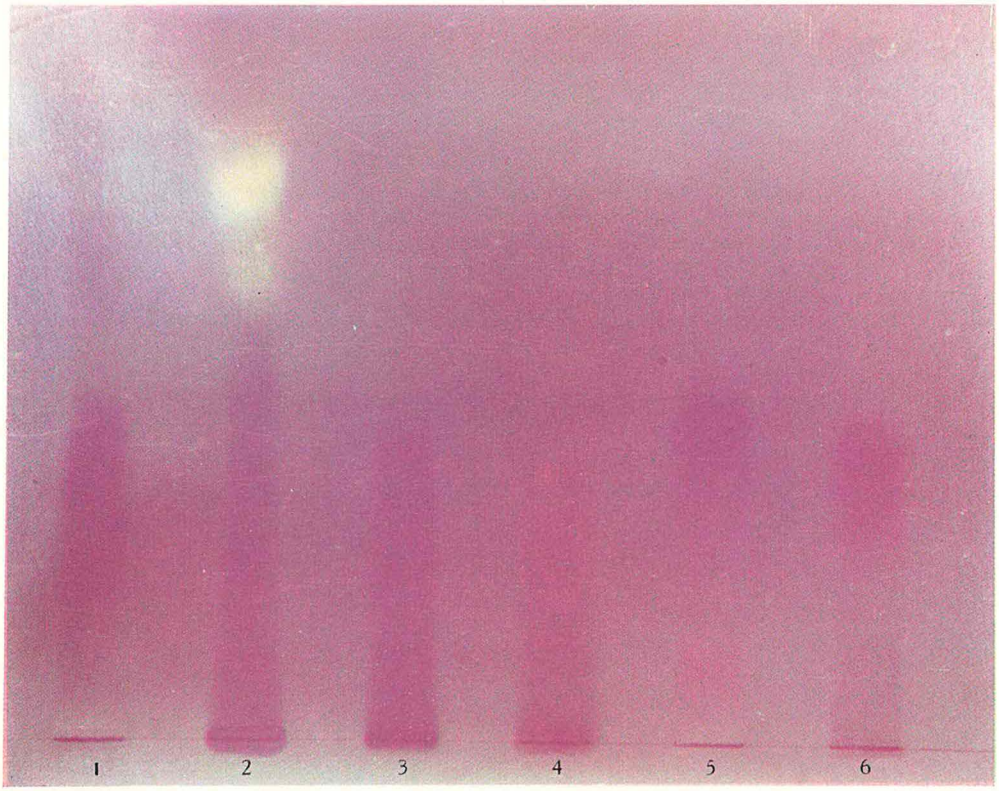

Fig. 4

Cromatografia discendente; carta Whatman n. 1; solvente fosforico tamponato di Britton-Robinson; durata 1 ora e 30 minuti; fronte a cm 17. Le fotografie si riferiscono all'intero cromatogramma e sono state eseguite alla luce ultravioletta ($m\mu$ 254) dopo l'esposizione del cromatogramma a vapori cloridrici (fig. 3) e a vapori ammoniacali (fig. 4).

L'influenza della diversa intensità della sorgente di luce UV nelle due zone laterali rende meno evidente la differenza delle colorazioni. Disposizione delle macchie: 1) Baco; 2) Merlot; 3) Baco + Merlot; 4) Peonina; 5) Malvina; 6) Peonina + Malvina. Descrizione dei risultati nel testo.

Fig. 3 - Cromatogramma esposto a vapori cloridrici

Fig. 4 - Cromatogramma esposto a vapori ammoniacali